Aus dem Pharmakologischen Institut der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München.
Vorstand: Professor Dr. A. Jodlbauer.

# UEBER NOVIRUDIN, EIN DIE BLUTGERINNUNG HEMMENDES MITTEL.

## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität

vorgelegt von

Karl-Rolf Essig
appr. Tierarzt.

MUENCHEN 1928.

BIBLIOTHEEK
RIJKS
UNIV.
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München.
Referent: Professor Dr. A. Jodlbauer.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

# Literatur.


26 Adler & Wiechowski, Archiv f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie. Bd. 92, S. 22, 1922.

10 Arthus & Pagès*, Journ. of physiol. Bd. 22, S. 739, 1890; Cpt. rend. hebdom. des séances de l'acad. des sciences. Bd. 115, S. 24, 1891.

8 Bordet*, Ann. de l'inst. Pasteur. Bd. 34, S. 561, 1920; Acad. roy. des méd. Belgique. Procés verbal de la séance du 24 juin 1911.

7 Bordet et Delange*, Berliner Klin. Wochenschrift, 1914, Nr. 11; Ann. de l'inst. Pasteur. Bd. 27, S. 341, 1913; Ann. et bull. de la soc. roy. des sciences méd. et nat. de Bruxelles, 1912, No. 8.

14 Bodong, Archiv f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie. Bd. 52, S. 242, 1905.

19 Contejean*, Arch. de physiol. Bd. 28, S. 159, 1896.

22 Delezenne*, Arch. de physiol. Bd. 28, S. 655, 1896. Bd. 30, S. 508, 1898.

11 Fonio, Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie. 6. Bd., 1. Hälfte, 1. Teil, S. 345.

6 Fuld*, Zentralblatt f. Physiologie. Bd. 17, S. 529, 1903.

17 Fuld und Spiro, Hofmeisters Beiträge, 1904. Bd. 5, S. 171.

20 Gley*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 48, S. 526, 1896.

21 Gley & Pachon*, Arch. de physiol. Bd. 28, S. 715, 1896.

18 Gratia*, Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. Bd. 83, S. 311, 1920; Ann. de l'inst. Pasteur. Bd. 35, S. 513, 1921.

3 Hekma*, Biochemische Zeitschrift. Bd. 62, S. 161; Bd. 63, S. 184; 204; Bd. 64, S. 86; Bd. 65, S. 311, 1914; Bd. 73, S. 370, 428; Bd. 74, S. 63, 219; Bd. 77, S. 219, 249, 256, 273, 1916.

4 Herzfeld und Klinger*, Biochemische Zeitschrift. Bd. 71, S. 195, 391; Bd. 75, S. 145, 1916; Bd. 82, S. 289, 1917.

25 Loeffler, Archiv f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie. Bd. 117, S. 189, 1926.

5 Morawitz*, Handbuch der Biochemie. 2. Aufl. Bd. 4, 1923; Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie. Bd. 4, S. 381, 1903; Die Chemie der Blutgerinnung. Ergebnisse der Physiologie. 1905, S. 307.

16 Morawitz*, Deutsches Archiv für klinische Medizin. 1904. Bd. 79, S. 15.

1 Nolf*, Ergebnisse der inn. Med. u. Kinderheilkunde. Bd. 10, S. 276, 1913.

23 Nolf*, Arch. internat. de physiol. Bd. 2, 1904/05.

15 Schittenhelm und Bodong, Arch. f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie. Bd. 54, S. 217, 1906.

24 Schlesinger & Reich, Chemikerzeitung. 49. Jahrg. Nr. 136, S. 961.

9 Schmidt A.*, Archiv f. Anatomie und Physiologie. 1861, S. 545; 1862, S. 438; Weitere Beiträge zur Blutlehre, 1895; Die Blutlehre, 1892.

12 Stubo und Sano*, Biochemische Zeitschrift. Bd. 134, S. 239, 1922.

13 Wöhlich & Paschkis*, Klinische Wochenschrift. 1923, Nr. 42 u. 51.

2 Woodridge*, Chemistry of the Blood. 1893.

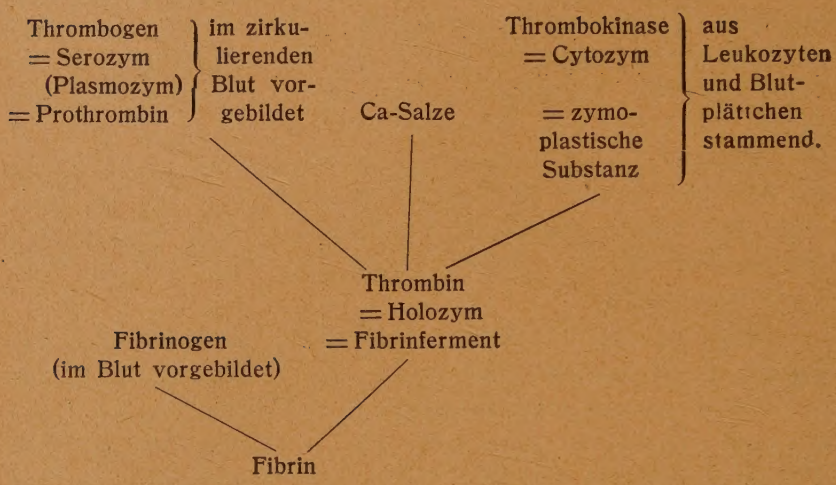
❖

Die mit * bezeichnete Literatur ist zitiert nach Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie VI. Bd., 1. Hälfte, 1. Teil, S. 321 ff., 344 ff.

Trotz zahlreicher gründlicher wissenschaftlicher Arbeiten auf dem Gebiete der Blutgerinnung haben wir doch bis heute noch keine sichergestellte Vorstellung von den Vorgängen der Blutgerinnung. Einzelne Forscher fassen die Gerinnung des Blutes als einen rein chemischen Prozeß auf (so Nolf [1] und Wooldridge [2]), andere als einen kolloidchemischen Vorgang (so Hekma [3], ähnlich auch Herzfeld und Klinger [4]). Die meisten aber halten auch heute noch an der alten Ansicht fest, daß es sich bei der Blutgerinnung um einen fermentativen Vorgang handelt.

Nach Ansicht von Morawitz [5] kommt die Gerinnung zustande durch die Umwandlung des im Plasma des strömenden Blutes vorhandenen Fibrinogens zu Fibrin, die durch das Ferment Thrombin veranlaßt wird. Dieses Fibrinferment Thrombin entsteht bei Anwesenheit von Kalksalzen aus dem im zirkulierenden Blutplasma präformierten Thrombogen durch die Fermentwirkung der erst extravaskulär (bzw. bei Berührung mit Fremdkörpern) von den Leukozyten und Blutplättchen (auch vom Gewebssaft) abgegebenen Thrombokinase. Diese Meinung teilt auch Fuld [6]. Dieser Auffassung entsprechend nehmen Bordet et Delange [7] an, daß das Thrombin aus dem Serozym (= Thrombogen von Morawitz) und dem Zytozym (= Thrombokinase) entsteht. Bordet [8] glaubt, daß nur eine Vorstufe des Serozyms, das Proserozym, im Blutplasma enthalten sei und dasselbe erst durch die anwesenden Kalksalze in Serozym übergeführt werde; die Kalksalze wirkten also schon früher und nicht erst bei der Bindung des Serozyms und Zytozyms zum Thrombin. Schon bei Schmidt A.[9], der das Thrombogen als Prothrombin und die Thrombokinase als zymoplastische Substanz bezeichnet, finden wir die Auffassung eines Fermentvorganges; doch wußte er noch nichts von der Notwendigkeit der Anwesenheit von Ca-Salzen; diese erkannten erst Arthus und Pagès [10].

Folgende Zeichnung gibt das über die Fermenttheorie Gesagte wieder:




Die Gerinnungsfähigkeit des Blutes kann nun durch verschiedene Mittel sowohl nach der positiven wie nach der negativen Seite beeinflußt werden. Mittel, welche die Gerinnung fördern, haben therapeutische Bedeutung; Mittel, welche die Gerinnung hemmen, sind für den Experimentator und Forscher wichtig. Die Verzögerung bzw. Aufhebung der Blutgerinnung ist unentbehrlich für zahlreiche Untersuchungen des Blutes, sei es nun, daß man das dem lebenden Tiere entnommene Blut flüssig halten, sei es, daß man bei Versuchen an den Gefäßen die Gerinnung des kreisenden Blutes hemmen will.

Abgesehen von der Kältewirkung [11] (Blut in gutgekühlten Glaszylindern bleibt längere Zeit flüssig) und der Paraffinierung [11] der Kanülen und Glasröhrchen, mit denen das Blut in Berührung kommt (das Plasma des unter diesen Vorsichtsmaßregeln zentrifugierten Blutes gerinnt erst, wenn es mit

einer benetzbaren Fläche in Kontakt kommt), wirken die die Gerinnung hemmenden bzw. verhindernden Mittel immer auf einen der bei der Gerinnung in Betracht kommenden Faktoren ein.

So bewirken alle Stoffe, die die Kalksalze fällen, Gerinnungshemmung; vor allem seien erwähnt: die Oxalate, die Citrate und Natriumfluorid. Nach der Ansicht von Stuber und Sano [12] soll die Wirkung der oxal- und zitronensauren Salze darauf beruhen, daß sie mit dem Fibrinogen eine weitgehend ionisierte Verbindung eingehen, die die Umbildung in Fibrin unmöglich macht. Bei den Fluoriden soll die Permeabilität der Membranen der Blutkörperchen derartig vermindert werden, daß keine Thrombokinase mehr abgegeben werden kann. Ein genügender Beweis für diese Ansicht ist aber durchaus nicht erbracht (Wöhlisch und Paschkis [13]).

Eine weitere Gruppe gerinnungshemmender Stoffe greift an den Fermenten an. Hierzu gehören verschiedene tierische Sekrete, unter denen das Hirudin, das Sekret der Speicheldrüsen von Hirudo medicinalis (Blutegel) am wichtigsten ist. Bodong [14] glaubte, daß die in diesem Präparat wirksamen Bestandteile durch Bindung an das Fibrinogen wirken. Nach weiteren Versuchen zusammen mit Schittenhelm [15] schloß er sich aber der Ansicht von Morawitz [16] und von Fuld und Spiro [17] an, die in dem Blutegelextrakt einen Bestandteil annehmen, der dem Thrombin (Holozym nach Fuld) oder gar schon dem Thrombogen (Plasmozym nach Fuld) entgegengesetzt wirkt, der also als Antithrombin, nicht aber als Antithrombokinase aufzufassen sei (Schittenhelm und Bodong [15]). Auch Gratia [18] vertritt dieselbe Ansicht.

Schließlich verdient noch eine Gruppe von Stoffen Erwähnung, die an und für sich nicht gerinnungshemmend wirken, die aber dem Organismus einverleibt diesen zur Bildung von Antiferment, nämlich Antithrombin, veranlassen. So wird bei Injektion von Wittepepton die Bildung dieses Antithrombins in der Leber ausgelöst und dasselbe an das Blut abgegeben (Contejean [19], Gley [20], Pachon [21], Delezenne [22], Nolf [23]).

Die meisten Mittel haben nun den Nachteil, daß sie in den Konzentrationen, die sicher gerinnungshemmend wirken, unerwünschte Nebenwirkungen haben. Das Hirudin (von der Firma Sachse & Co. in den Handel gebracht) ist ohne Zweifel das Beste, was wir bisher hatten. Doch ist der Preis derart hoch (0,1 g kostet RM. 15.—), daß es für wissenschaftliche Arbeiten in größerem Umfange nicht in Frage kommen kann. Es wird nun von der chemischen Fabrik „Norgine" von Dr. Viktor Stein in Aussig ein neueres Präparat mit dem Namen „Novirudin" hergestellt, das aber mit dem alten Hirudin in chemischer Hinsicht nichts zu tun hat. Der Zweck dieser Arbeit soll nun sein, Aufschluß über die Brauchbarkeit des Novirudins zu geben. Bisherige experimentelle Untersuchungen liegen vor von Schlesinger und Reich [24] und von Loeffler [25].

Das Novirudin ist ein dunkelbraunes bis schwarzes, leichtes Pulver. In Wasser und physiologischer Kochsalzlösung löst es sich gut bis auf einen kleinen Bruchteil. Die Reaktion ist sauer. Eine Mitteilung über die genaue Zusammensetzung des Präparates ist in der Literatur nicht zu finden. Nur soviel ist bekannt, daß es der Melaninsäuregruppe angehört. Veranlaßt wurde die Herstellung des Präparates von Adler und Wiechowski [26], denen es gelungen war, durch Oxydation aus Tyrosin, sowie auch aus Braunkohle, Torf und anderen Substanzen Melaninsäuren zu gewinnen, denen eine blutgerinnungshemmende Wirkung zukommt.

❖

I.

# Eigene Versuche über die gerinnungshemmende Wirkung des Novirudins.

## 1. Reagenzglasversuche.

Kleine sterile Gläschen wurden mit 1 ccm der Novirudinlösung in verschiedener Konzentration — stets gelöst in physiologischer Kochsalzlösung — beschickt. Darauf ließ ich aus der Vene eines Pferdes je 5 ccm Blut einlaufen. Durch leichtes Schwenken wurde der Zeitpunkt der Gerinnung festgestellt. Die Versuche ergaben:

| Novirudin in % im Blut | Zeit bis zur Gerinnung |
|---|---|
| ohne Zusatz | fast sofort |
| 0,001 | ½ Stunde |
| 0,025 | 1 Stunde |
| 0,05 | 2½ Stunden |
| 0,1 | nach 9 Stunden noch ungeronnen |

Die Angaben, die bisher vorliegen, sind somit bestätigt. Außerdem wurden Versuche angestellt, ob das mit 0,1 % Novirudin versetzte Blut durch Zusatz von Ca-Salzen oder durch Zusatz von Clauden wiederum zur Gerinnung zu bringen ist; die Versuche fielen negativ aus. Es deckt sich dies wiederum mit den Angaben von Schlesinger und Reich [24].

## 2. Versuche bei Einverleibung in den Organismus.

### Intravenöse Injektion.

Den Kaninchen, die als Versuchstiere dienten, wurde das Novirudin in 1prozentiger Lösung — gelöst in physiologischer

Kochsalzlösung und filtriert — in die Vena jugularis injiziert. Durch eine in die Carotis eingelegte Dauerkanüle, die in der Zwischenzeit geschlossen gehalten wurde, wurde von Zeit zu Zeit Blut entnommen. Die folgenden Versuchsprotokolle zeigen die Wirkung des Novirudins auf die Gerinnung.

Versuch a) Kaninchen (weibl., 2350 g) erhält 75 mg Novirudin pro kg Körpergewicht in 1prozentiger Lösung intravenös. Somit war bei Annahme der Blutmenge von $^1/_{13}$ des Körpergewichts 0,1 % im Blut.

| Zeit der Blutentnahme nach der Injektion | Zeit bis zur Gerinnung |
|---|---|
| 30 Minuten | erst nach ca. 4 Tagen — es waren bereits Fäulniserscheinungen festzustellen — trat lockere Gerinnung, durch Schütteln wieder lösbar, ein |
| 1 Stunde | |
| 1½ Stunden | |
| 2 „ | |
| 2½ „ | |
| 3 „ | |
| 3½ „ | |
| 4 „ | |
| 5 „ | |
| 6 „ | |
| 7 „ | 8 Stunden |
| 8 „ | 7 „ |

Versuch b) Kaninchen (weibl., 2460 g) erhält 35 mg Novirudin pro kg Körpergewicht in 1prozentiger Lösung intravenös; somit war bei Annahme der Blutmenge von $^1/_{13}$ des Körpergewichtes 0,05% im Blut.

| Zeit der Blutentnahme nach der Injektion | Zeit bis zur Gerinnung |
|---|---|
| ½ Stunde | 4 Stunden |
| 1 „ | 3 „ |
| 2 „ | 10 Minuten |
| 3½ „ | 5 Minuten |

Versuch c) Henne (1170 g) erhält ca. 30 mg Novirudin pro kg Körpergewicht in 1prozentiger Lösung intravenös — bei Annahme einer Blutmenge von $^1/_{13}$ des Körpergewichts war annähernd 0,05% im Blut — injiziert. Das Huhn wurde aus dem Grunde gewählt, da sein Blut außerordentlich rasch gerinnt.

| Zeit der Blutentnahme nach der Injektion | Zeit bis zur Gerinnung |
|---|---|
| 30 Minuten | 30 Minuten |
| 1 Stunde | fast sofort |

Intravenös injiziert zeigt sich also eine sehr lange Zeit anhaltende Hemmung der Blutgerinnung; sogar niederere Konzentrationen, als Loeffler [25] angab, führen zum Ziele. Eine Menge von 0,05 % Novirudin im zirkulierenden Blute genügt, um das Blut mehrere Stunden ungerinnbar zu machen. Bei 0,05 % und selbst bei 0,1 % sieht man außer obiger Wirkung nichts. Kapillarblutungen, wie Löffler angab, waren bei der Sektion weder dieser 3 Versuchstiere, noch bei anderen weiteren Versuchen feststellbar. Die Zahl und Tiefe der Atemzüge blieb ziemlich unbeeinflußt; ebenso die Pulsfrequenz.

## Subkutane Injektion.

Was bei intravenöser Injektion leicht erreichbar ist, läßt sich bei subkutaner Darreichung schwer bzw. nicht erreichen, wie auch Schlesinger und Reich [24] festgestellt haben. So kommt man bei Meerschweinchen selbst mit toxischen Dosen nicht zum Ziele; dagegen gelingt es, bei Mäusen durch subkutane Injektion von allerdings toxischen Dosen eine längere Hemmung der Blutgerinnung hervorzurufen, wie folgende Tabelle zeigt.

| Gewicht der Maus | Dosis pro kg Körpergewicht | Zeit der Blutentnahme nach Injektion | Zeit bis zur Gerinnung |
|---|---|---|---|
| 18 g | 0,75 g | ½ Stunde | nach 24 Std. noch ungeronnen |
| 20 g | 0,5 g | ½ „ | |
| 19 g | 0,25 g | ½ „ | ½ Stunde |
| 18 g | 0,5 g | 2 Stunden | nach 24 Std. noch ungeronnen |
| 17 g | 0,25 g | 2 Stunden | 20 Minuten |
| 22 g | ohne Nov.-Injektion | — | 10 Minuten |

Bei Fischen, deren Blut außerordentlich rasch gerinnt — wodurch Untersuchungen des Haemoglobingehaltes und der Zahl der Blutkörperchen fast unmöglich werden, obwohl solche Untersuchungen sicherlich sehr wertvoll wären — läßt sich durch Injektion von Novirudin in die Lymphsäcke, die seitlich der hinteren Rückenflosse gemacht wird, die Blutgerinnung hemmen, aber auch nur solange, daß Blutuntersuchungen in obiger Richtung durchführbar sind. Als Versuchstiere dienten junge Hechte.

| Gewicht des Fisches | Dosis pro kg Körpergewicht | Zeit der Blutentnahme nach Injektion | Ergebnis: |
|---|---|---|---|
| 250 g | 0,15 g | 4 Std. 30 Min. | Nach ca. 3 Minuten zwar keine Gerinnung, aber Auftreten von Flöckchen, die sich beim Schütteln wiederum lösen |
| 280 g | 0,15 g | 30 Minuten | ebenso |
| 260 g | 0,3 g | 1 Stunde | Während 10 Minuten ungerinnbar. Weiter nicht beobachtet, da Blut zu Ca-Bestimmung benutzt wurde |

II.

# Toxische Versuche.

## A. Versuche an Einzelligen.

### 1. Wirkung auf Paramaecien.

Um die allgemeine Protoplasmawirkung des Novirudins festzustellen, wurden Versuche mit Paramaecien angestellt. Reinkulturen von Paramaecium caudatum wurden mit Novirudinlösungen verschiedener Konzentration versetzt; in einer feuchten Kammer wurde je 1 Tropfen Paramaecienkultur mit 1 Tropfen Novirudinlösung vermischt.

In einer Konzentration unter 0,5 % Novirudin im Gemenge blieben die Paramaecien augenscheinlich lange Zeit unverändert; in 0,5prozentiger Lösung kommt es zu Austritt von Protoplasma und nachfolgendem Zerfall; bei 1prozentiger Lösung tritt an Stelle des Zerfalls eine Fixierung.

Das spricht dafür, daß es sich nur um Säurewirkung handelt, worüber später noch zu berichten ist.

### 2. Versuche an roten Blutkörperchen.

Verwendet wurden die nach der üblichen Methode serumfrei gewaschenen roten Rinderblutkörperchen; zu je 0,2 ccm dieser Blutkörperchen wurde 1 ccm Novirudinlösung in Konzentrationen von 0,05—2 % zugesetzt. Die Einwirkungsdauer des Novirudins betrug bei einer Versuchsreihe ¾ Stunden, bei einer anderen 2 Stunden, worauf durch fünfmaliges Waschen und Zentrifugieren die Novirudinlösung entfernt wurde.

Bei Konzentration des Novirudins von 0,5 % aufwärts trat eine Braunfärbung der Blutkörperchen ein, die bei längerer Einwirkung stärker wurde. Um zu erfahren, worauf diese Braunfärbung beruht, wurden die gewaschenen Blutkörperchen mittels destilliertem Wasser lysiert. Methaemoglobin

war nicht nachweisbar. Die Lösung zeigte vielmehr die beiden für Oxyhaemoglobin charakteristischen Absorptionsstreifen, so daß es den Eindruck macht, als ob die Braunfärbung nur auf dem Novirudin — vielleicht an die roten Blutkörperchen fixiert oder in das Innere derselben aufgenommen — beruht. Die von 2prozentiger Novirudinlösung beeinflußten Blutkörperchen ließen sich nicht mehr lysieren. Mikroskopisch beobachtet, erwiesen sie sich als weitgehend morphologisch verändert. Auch hier macht es wieder den Eindruck, daß es sich nur um Säurewirkungen handelt.

## B. Versuche an höher Organisierten.

Von höher organisierten Tieren dienten Frösche, Mäuse und Meerschweinchen als Versuchsobjekte. Das Novirudin wurde als filtrierte Lösung den Fröschen in den Rückenlymphsack injiziert, bei Mäusen und Meerschweinchen subkutan appliziert.

### 1. Versuche an Fröschen.

Während eine Injektion von 0,5 ccm der 2prozentigen filtrierten Novirudinlösung in den Rückenlymphsack ohne sichtbare nachteilige Folgen blieb, bewirkte die Einspritzung von 1 ccm der 2prozentigen Lösung Rötung der Schleimhäute, Blutungen an den Zehen, wenn diese zufällig verletzt waren, Abnahme der Reflexbewegungen und nach ungefähr 48 Stunden den Tod der Versuchstiere.

Ein nach Giemsa gefärbter Blutabstrich zeigte erheblich mehr Leukozyten als das zum Vergleich angefertigte Präparat eines gesunden Frosches.

Der Sektionsbefund war bei allen verendeten Fröschen derselbe: Die Muskeln sahen hühnerfleischähnlich aus und unter der Haut befanden sich vereinzelt Blutungen.

### 2. Versuche an Mäusen.

Eine größere Anzahl von Mäusen erhielt subkutane Injektionen von verschiedenen Mengen Novirudin.

Die Dosis von 0,75 g pro kg Körpergewicht wirkte innerhalb 24 Stunden tödlich. Außer einer lehmbraunen Beschaffenheit des Unterhautzellgewebes an der Injektionsstelle und eines lehmbraunen Darminhaltes war nichts Besonderes bei der Sektion festzustellen. Nicht bei allen Versuchstieren führte dagegen die Injektion von 0,5 g Novirudin pro kg Körpergewicht zum Tode. Die Dosis von 0,25 g wurde ohne äußerlich sichtbare Krankheitserscheinungen ertragen.

### 3. Versuche an Meerschweinchen.

Auch bei Meerschweinchen wird eine Dosis von 0,25 g Novirudin pro kg Körpergewicht subkutan meistens noch ertragen. Bei Wiederholung dieser Dosis nach 8 Tagen gehen die Tiere zugrunde.

Bei der Sektion zeigt sich sulzige Beschaffenheit der Injektionsstellen, die in ziemlichem Umfange intensiv braun gefärbt sind; auch der Magen- und Darminhalt zeigt starke Braunfärbung, die wahrscheinlich von dem in den Darm zur Ausscheidung gekommenen Novirudin herrührt.

❖

III.

# Versuche an isolierten Organen.

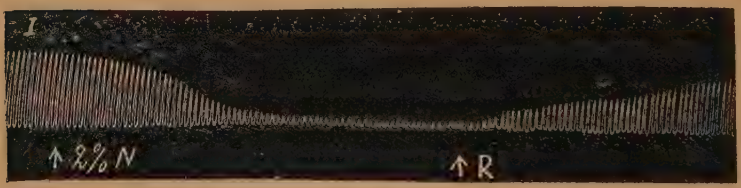
Um eventuelle Nebenwirkungen auf Herz und Gefäße festzustellen, wurden Versuche am isolierten Froschherz und an isolierten Gefäßen angestellt.

## 1. Versuche am isolierten Froschherz.

Die Versuche wurden an einem Froschherz, das an der Straub'schen Kanüle arbeitete, ausgeführt. Das in Froschringer gelöste Novirudin wurde der das Herz versorgenden Ringerlösung zugesetzt.

Folgende Kurven veranschaulichen die Wirkung.

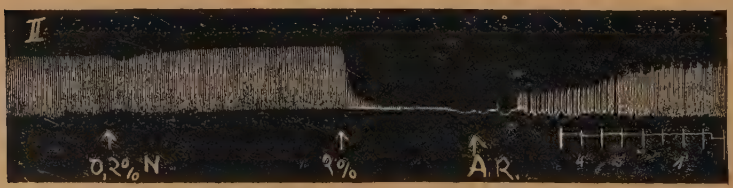
Kurve I:




Bei Zusatz von ½ ccm der 2prozentigen Novirudinlösung zu den 1½ ccm in der Straub'schen Kanüle befindlichen Ringerlösung — also 0,5 % Novirudin im Gemenge — nimmt die Hubhöhe des Herzens stark ab (starke inotrope Wirkung).

Durch Auswaschen mit Froschringer läßt sich die Schädigung wieder beseitigen; es bleibt nur eine leichte Arythmie zurück.

Kurve II:



Bei einem zweiten Versuch wird 1 ccm der 0,2prozentigen Novirudinlösung zu 1 ccm Ringerlösung — also 0,1 % Novirudin im Gemenge — zugegeben; es tritt eine kaum erkennbare inotrope Wirkung ein.

Bei Ersatz durch 1 ccm der 2prozentigen Lösung — 1 % Novirudin im Gemenge — kommt es zu Herzstillstand. Auch hier tritt wiederum Erholung nach Ausspülung mit Ringerlösung ein.

Nachdem sich selbst eine 0,1prozentige Lösung als wirkungslos gezeigt hat, darf angenommen werden, daß eine wesentliche Schädigung des Herzens nicht in Betracht kommt.

### 2. Versuche an isolierten Gefäßen.

Die Versuche wurden am Laewen-Trendelenburg'schen Gefäßpräparat ausgeführt. Einem dekapitierten Frosch wird eine Kanüle in die Aorta eingeführt, während sich eine weitere Kanüle in der Bauchvene befindet. Unter geringem Druck läßt man Froschringerlösung von der Aortenkanüle aus durch die Gefäße der hinteren Extremität strömen. Die Zahl der aus der Bauchvenenkanüle wieder abfließenden Tropfen wird durch einen Schreibhebel am Kymographium verzeichnet und läßt einen Schluß über die jeweilige Gefäßweite zu.

Das Novirudin — in Froschringerlösung gelöst — wurde in den Schlauch, der zur Aortenkanüle führte, eingespritzt.

Es zeigte sich bei den Versuchen, daß bei Injektion einer 0,02prozentigen Novirudinlösung keine offensichtliche Wirkung eintrat, während der Zusatz von 0,2prozentiger Lösung innerhalb 5 Minuten die Zahl der aus der Kanüle abfließenden Tropfen auf das Dreifache der ursprünglichen Zahl (nämlich 22 bis 23 Tropfen pro Minute) ansteigen ließ. Somit muß eine Gefäßerweiterung eingetreten sein. Diese Gefäßerweiterung hält lange an; noch nach 40 Minuten ist die Zahl der aus der Bauchvenenkanüle abfließenden Tropfen fast die gleiche (20 bis 21 Tropfen). Das ist besonders deshalb erwähnenswert, weil im Normalpräparat durch das sich entwickelnde Oedem die

Menge der aus der Vene abfließenden Ringerlösung immer mehr abnimmt.

Durch Zufuhr von Suprarenin 1 : 10 000 000 verengerten sich die Gefäße wieder so stark, daß die Tropfenzahl nur mehr 2—3 pro Minute betrug.

Eine erneute Injektion der 0,2prozentigen Novirudinlösung führte sofort wiederum zum starken Ansteigen der Tropfenzahl und hob somit die Adrenalinwirkung auf.

❖

IV.

# Besondere Versuche zur Erklärung der Wirkung.

## 1. Verhalten des Novirudins gegenüber anorganischen Salzen.

In erster Linie wurde untersucht, inwieweit Salzzusätze Veränderungen in Novirudinlösungen hervorrufen.

Eine 1prozentige Novirudinlösung wurde solange zentrifugiert, bis sich kein Bodensatz mehr bildete, um sicher zu sein, daß die Lösung vollständig ist.

Zu je 0,25 ccm dieser 1prozentigen Lösung wurden 0,25 ccm verschiedener Salzlösungen in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Nach Einwirkungsdauer von ¼ Stunde erfolgte neuerdings das Zentrifugieren in Spitzgläsern, um festzustellen, von welchen Konzentrationen ab die einzelnen Salze Fällungen in Novirudinlösungen hervorrufen. Aus den zahlreichen Versuchen seien hier nur die niedersten Konzentrationen angegeben, die eben noch zur Fällung führen. Die Salzkonzentrationen sind in molarer Lösung angegeben, und zwar beziehen sich die Angaben auf das Gemisch von Novirudin und Salzlösung.

Die eben noch Fällung hervorrufenden Salzkonzentrationen sind:

| | | |
|---|---|---|
| Natriumsulfat | 0,4 | mol. Lösung |
| Natriumbromid und Kaliumjodid | 0,3 | „ „ |
| Natrium- und Kaliumchlorid | 0,25 | „ „ |
| Magnesiumchlorid | 0,01666 | „ „ |
| Calciumchlorid | 0,0053 | „ „ |
| Bariumchlorid | 0,00357 | „ „ |
| Aluminiumchlorid | 0,001666 | „ „ |

Aus den Versuchen ist ersichtlich, daß Magnesiumchlorid und noch stärker Calcium- und Bariumchlorid selbst in sehr starken Verdünnungen Fällungen hervorrufen. Es scheint das doch ein Fingerzeig dafür zu sein, daß auch das Calcium des Blutes durch Novirudinzusatz Veränderungen erfährt, wenn es auch nicht zu sichtbarer Fällung desselben kommt.

### 2. Aciditätbestimmung.

Es ist von Bedeutung, den pH-Wert frischbereiteter Novirudinlösung festzustellen, und da im tierärztlichen pharmakologischen Institut keine Einrichtungen dafür vorhanden sind, hat in liebenswürdiger Weise F. Haffner, Tübingen, diese Untersuchungen mittels der Gaskette gemacht.

Der pH-Wert einer 0,1prozentigen Novirudinlösung ist 6.0—6.2, der einer 1prozentigen Novirudinlösung 4.8.

Es ergibt sich somit, daß Novirudinlösungen einen nicht unwesentlichen Säuregrad besitzen.

### 3. Einfluß des Novirudins auf das Labferment.

Die in Abschnitt 1 beschriebene Fällung des Calciumchlorids durch Novirudinlösungen war Veranlassung zur Prüfung, ob nicht vielleicht ähnlich wie die Blutgerinnung auch die Milchgerinnung durch das Novirudin gestört wird.

Zu diesem Zwecke wurden je 100 ccm Milch mit 5 ccm Novirudinlösung von verschiedener Konzentration, bzw. in einer anderen Versuchsreihe mit 5 ccm Natriumoxalatlösung verschieden hoher Konzentration versetzt. Die Milch wurde sodann im Thermostaten auf 35° C. erwärmt, worauf Zusatz von je 2 ccm 1 : 20 verdünnten Käselabextrakts (in liebenswürdiger Weise von Fa. Bayer-Augsburg zur Verfügung gestellt) erfolgte.

Während Milch ohne Novirudin bzw. Oxalat nach 7 bis 10 Minuten gerann, trat bei der mit der 2prozentigen Novirudinlösung versetzten Milch (0,093% Novirudin im Gemenge) die Gerinnung erst nach 45 Minuten ein. Die Milch mit der

Zugabe der 2prozentigen Natriumoxalatlösung (d. i. 0,093 % im Gemenge) war noch nach 1 Stunde ungeronnen. Bereits bei 0,02 % Zusatz von Novirudin bzw. Oxalat im Gemenge war eine Gerinnungshemmung nicht mehr mit Sicherheit festzustellen.

Es sind also ziemlich die gleichgroßen Zusätze von Novirudin und von Natriumoxalat notwendig, um die Milchgerinnung stark zu hemmen. Allerdings ist gegen die Versuche mit Novirudin einzuwenden, daß durch den Novirudinzusatz die Reaktion der Milch nach der sauren Seite verschoben wird, was allein schon eine Hemmung der Labfermentwirkung herbeiführt. Somit besteht, diesen Einwand unberücksichtigt lassend, eine Analogie zur Gerinnung des Blutes.

### 4. Einwirkung auf die Hefegärung.

Um zu sehen, ob Novirudin allgemein die Fermente inaktiviert, wurde der Einfluß auf die Hefegärung untersucht.

Zu diesem Zwecke setzten wir zu 40 ccm 10prozentiger Traubenzuckerlösung 5 ccm einer feinstverteilten Aufschwemmung von Bierhefe und 5 ccm einer Novirudinlösung verschiedener Konzentration; die auf diese Weise hergestellten Mischungen kamen in Gärungsröhren, die sodann 6 Stunden lang bei konstanter Temperatur von 26,5° C. gehalten wurden. Daraufhin wurden die gebildeten $CO_2$-Mengen bestimmt.

In folgender Tabelle sind die Novirudinkonzentrationen im Gemenge angegeben. Die angegebene $CO_2$-Menge ist auf 100 ccm Lösung berechnet.

| Nov.-Konzentration | gebildete $CO_2$-Menge |
|---|---|
| ohne Zusatz | $32^1/_2$ |
| 0,01 % | $33^1/_3$ |
| 0,05 % | 42 |
| 0,1 % | 47 |
| 0,2 % | 55 |

Somit ist das Novirudin kein allgemeines Fermentgift. Daß es in schon verhältnismäßig niederer Konzentration die Fermenttätigkeit der Hefe steigert, ist wohl wiederum auf Säurewirkung zu beziehen.

Es werden somit nur die Fermente inaktiviert, die zur Blutgerinnung und zur Milchgerinnung führen, und auch hierdurch drängt sich die Vermutung auf, daß die Wirkung des Novirudins auf die Gerinnungshemmung mit der Beeinflussung des Kalks zusammenhängt.

❖

# Zusammenfassung.

1. Intravenöse Injektionen von 0,035 g Novirudin pro kg Körpergewicht genügen, um das Blut mindestens 1 Stunde lang ungerinnbar zu machen. Nebenwirkungen sind bei der intravenösen Einverleibung dieser Menge nicht zu sehen.

2. Bei subkutaner Anwendung sind erst die tödlichen Dosen (0,5 g Novirudin pro kg Körpergewicht) — und hierbei auch nur bei einzelnen Tierarten — ausreichend, die Gerinnung des Blutes zu hemmen. Es hängt dies jedenfalls mit der zu geringen Resorbierbarkeit des Novirudins zusammen.

3. Höhere Dosen, als zur Hemmung der Gerinnbarkeit notwendig sind, schädigen das Herz und führen zur Gefäßerweiterung.

4. Die Schädigung des Herzens, am isolierten Froschherz nachgewiesen, beruht wohl nur auf einer Säurewirkung; denn das Novirudin hat ziemlich starke saure Reaktion (pH-Wert einer 0,1prozentigen Lösung ist 6.0—6.2, einer 1prozentigen Lösung ist 4.8).

5. Die gefäßerweiternde Wirkung, am Laewen-Trendelenburg'schen Präparat nachgewiesen, dürfte nicht allein auf den saueren Charakter der Substanz zu beziehen sein. Die gefäßerweiternde Wirkung läßt sich durch Adrenalin beseitigen und umgekehrt bildet sich die Adrenalinwirkung durch Novirudinlösung rasch zurück.

6. Bei hohen Konzentrationen (0,5—1 %) nehmen die roten Blutkörperchen braune Farbe an; es handelt sich hierbei wohl nur um Anlagerung oder Aufnahme des braunschwarzen Novirudins an bzw. in die Körperchen. Bei noch höherer Konzentration (2 %) werden die Blutkörperchen stark verändert (fixiert), was wohl nur auf einer Säurewirkung beruht.

7. Zur Erklärung der die Gerinnung hemmenden Wirkung sei angegeben, daß Ca selbst in sehr niederen Konzentrationen (0,0053 Mol im Gemenge) in einer 1prozentigen Novirudinlösung fällend wirkt; ferner, daß die Milchgerinnung ungefähr durch die gleichen Konzentrationen wie die Blutgerinnung gehemmt wird. Das spricht doch dafür, daß die Wirkung des Novirudins auf Veränderung des Kalkes im Blut beruht. Allerdings ist die Angabe richtig, daß man das durch Novirudin ungerinnbar gewordene Blut durch nachträglichen Kalkzusatz nicht mehr zur Gerinnung bringen kann. Ein allgemeines Fermentgift ist das Novirudin sicher nicht, was an der Hefegärung nachgewiesen wurde.

❖

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Albert Jodlbauer, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und deren tatkräftige Förderung; desgleichen danke ich Herrn Privatdozenten Dr. Karl Hilz für sein bereitwilliges Entgegenkommen bei der Ausführung der zahlreichen Versuche.

# Lebenslauf.

Ich, Karl-Rolf Essig, bin geboren am 13. September 1902 zu Niedermoschel als Sohn des Gewerbeschuldirektors Karl Essig und dessen Ehefrau Anna, geb. Bittighofer. — Ich besuchte die Lateinschule zu Winnweiler und dann das Gymnasium zu Bad Kreuznach, wo ich Frühjahr 1922 das Reifezeugnis erhielt. In der Folge studierte ich Rechtswissenschaft an den Universitäten München, Würzburg, Frankfurt a. M. Sommersemester 1925 widmete ich mich dem Studium der Tierheilkunde an der Universität München und erlangte daselbst im Frühjahr 1928 die Approbation als Tierarzt.

Die vorliegende, mir vom Vorstand des pharmakologischen Institutes der tierärztlichen Fakultät München zugewiesene Arbeit, hatte ich schon vor der Approbation begonnen, um sie Juli 1928 zu beenden.